

Pharmacological Analysis of Brain Histamine Clearance

著者	長沼 史登
号	85
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3519号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00097156

(書式12)

氏名	ながぬま ふみと 長沼 史登
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Pharmacological Analysis of Brain Histamine Clearance (脳内ヒスタミン除去機構に関する薬理学的解析)
論文審査委員	主査 教授 谷内 一彦 教授 柳澤 輝幸 教授 菅原 明

論文内容要旨

ヒスタミンは、中枢神経系において神経伝達物質として機能している活性アミンである。脳内ヒスタミン系は睡眠覚醒や食欲などを調節する極めて重要な神経系であり、アルツハイマー病やナルコレプシーなど様々な中枢神経疾患ではヒスタミン神経系の活動が減弱していることが明らかとなっている。神経活動を制御する機構として、トランスポーターや代謝酵素による神経伝達物質の除去機構が挙げられるが、脳内ヒスタミン除去機構はほとんど不明なままであった。そこで私は脳内ヒスタミン除去機構について薬理学的解析を行い、ヒスタミン神経系の制御機構を明らかにすることで、様々な中枢神経疾患の病態解明や新規治療標的分子の提唱につなげていきたいと考えた。

先行研究によりヒスタミンの除去にはニューロンではなくアストロサイトが重要であると報告されている。そこでまず、初代培養ヒトアストロサイトを用いてヒスタミン除去の分子メカニズムについて検討を行った。ヒスタミンを代謝する酵素には *diamine oxidase* と *histamine N-methyltransferase* (HNMT) の二種類が知られているが、ヒトアストロサイトには HNMT のみが発現していることが確認できた。HNMT の細胞内局在については議論が分かれており、細胞膜上に局在し細胞外ヒスタミンを不活化する説と、輸送体による取り込みの後に細胞質に存在する HNMT が不活化を行う説が唱えられていた。私は細胞分画法および細胞免疫染色を用いた検討により、HNMT は細胞質にのみ発現していることを明らかにした。従ってヒスタミンの不活化にはトランスポーターを介した取り込みの過程が必須であり、次に責任トランスポーターの同定を行った。その結果、ヒトアストロサイトには、*organic cation transporter 3* (OCT3) および、*plasma membrane monoamine transporter* (PMAT) の発現しており、薬物阻害実験と siRNA を用いたノックダウンにより OCT3 と PMAT がヒスタミン取り込みに寄与していることが明らかとなった。以上のことから、ヒトアストロサイトはヒスタミンを OCT3、PMAT を介して取り込み、細胞質に局在する HNMT で不活化するという、ヒスタミン除去の分子機構を初めて明らかにした。

次に、上述した分子機構の生体における詳細な役割を明らかにしたいと考え、まず HNMT に着目しそのノックアウトマウス (KO) を解析した。まず、脳内ヒスタミン濃度を測定したところ、KO において野生型の約 6 倍にヒスタミン量が増加しており、HNMT が脳内ヒスタミン濃度調

(書式12)

節において極めて重要であることが確認できた。次に、睡眠解析を行った結果、KOにおいて本来マウスの休息期である明期においては覚醒時間が延長し、逆に暗期においては睡眠時間が延長するという睡眠覚醒サイクルの異常が確認された。これらの表現型は、覚醒アミンであるヒスタミンの濃度上昇が明期の覚醒時間の延長をもたらし、その代償的な変化として暗期の睡眠時間が延長していることが考えられた。これらに加え、KOは皮膚に創傷を受けている割合が有意に多いことが分かった。Resident-intruder testなどの行動実験においてKOにのみ高い攻撃性が認められたため、HNMTの欠損はマウスにおいて高い攻撃性を引き起こすことが明らかとなった。以上のことから、HNMTは脳内ヒスタミン濃度を正常に維持するために必須であり、ヒスタミンの濃度調節を介して、睡眠覚醒サイクルおよび攻撃性に関与していることが考えられた。

本研究によりヒスタミン除去機構の分子メカニズムが初めて明らかとなり、HNMTの生体における重要性についても示す事ができた。今後トランスポーターのノックアウトマウス解析やより有効な阻害剤開発を進め、脳内ヒスタミン系の全容解明、そして中枢神経疾患の治療に貢献していきたいと考えている。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 Pharmacological Analysis of Brain Histamine Clearance
..... (脳内ヒスタミン除去機構に関する薬理学的解析)

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 機能薬理学分野

学籍番号 B2MD5093 氏名 長沼 史登

ヒスタミンは、中枢神経系において神経伝達物質として機能している活性アミンである。脳内ヒスタミン系は睡眠覚醒や食欲などを調節する極めて重要な神経系であり、アルツハイマー病やナルコレプシーなど様々な中枢神経疾患ではヒスタミン神経系の活動が減弱していることが明らかとなっている。神経活動を制御する機構として、トランスポーターや代謝酵素による神経伝達物質の除去機構が挙げられるが、脳内ヒスタミン除去機構は不明なままであった。本研究は脳内ヒスタミン除去機構について薬理学的解析を行い、ヒスタミン神経系の制御機構を脳内ヒスタミンの分解系から明らかにすることを目的とした。

先行研究によりヒスタミンの除去にはニューロンではなくアストロサイトが重要であると報告されている。そこで本研究は最初に初代培養ヒトアストロサイトを用いてヒスタミン除去の分子メカニズムについて検討を行った。ヒスタミンを代謝する酵素には diamine oxidase と histamine *N*-methyltransferase (HNMT) の二種類が知られているが、ヒトアストロサイトには HNMT のみが発現していることが確認できた。HNMT の細胞内局在については議論が分かれており、細胞膜上に局在し細胞外ヒスタミンを不活化する説と、輸送体による取り込みの後に細胞質に存在する HNMT が不活化を行う説が唱えられていた。本研究は細胞分画法および細胞免疫染色を用いた検討により、HNMT は細胞質にのみ発現していることを明らかにした。従ってヒスタミンの不活化にはトランスポーターを介した取り込みの過程が必須であり、次に責任トランスポーターの同定を行った。その結果、ヒトアストロサイトには、organic cation transporter 3 (OCT3) および、plasma membrane monoamine transporter (PMAT) の発現しており、薬物阻害実験と siRNA を用いたノックダウンにより OCT3 と PMAT がヒスタミン取り込みに寄与していることが明らかとなった。以上のことから、ヒトアストロサイトはヒスタミンを OCT3、PMAT を介して取り込み、細胞質に局在する HNMT で不活化するという、ヒスタミン除去の分子機構を初めて明らかにした。

次に、上述した分子機構の生体における詳細な役割を明らかにしたいと考え、まず HNMT に着目しそのノックアウトマウス (KO) を解析した。まず、脳内ヒスタミン濃度を測定したところ、KO において野生型の約 6 倍にヒスタミン量が増加しており、HNMT が脳内ヒスタミン濃度調節において極めて重要であることが確認できた。次に、睡眠解析を行った結果、KO において本来マウスの休息期である明期においては覚醒時間が延長し、逆に暗期においては睡眠時間が延長するという睡眠覚醒サイクルの異常が確認された。これらの表現型は、覚醒アミンであるヒスタミンの濃度上昇が明期の覚醒時間の延長をもたらす、その代償的な変化として暗期の睡眠時間が延長していることが考えられた。これらに加え、KO は皮膚に創傷を受けている割合が有意に多いことが分かった。Resident-intruder test などの行動実験において KO にのみ高い攻撃性が認められたため、HNMT の欠損はマウスにおいて高い攻撃性を引き起こすことが明らかとなった。以上のことから、HNMT は脳内ヒスタミン濃度を正常に維持するために必須であり、ヒスタミンの濃度調節を介して、睡眠覚醒サイクルおよび攻撃性に関与していることが考えられた。

本研究は初めてヒスタミン除去機構の分子メカニズムを明確にして、さらにヒスタミン代謝酵素である HNMT の生体における重要性についても明らかにすることができた独創的な研究である。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。